

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-103858

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月20日

(51) Int.Cl.⁴
C 1 2 N 15/09

識別記号

F I
C 1 2 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平9-286066

(22) 出願日 平成9年(1997)10月1日

(71) 出願人 597147588

テーアールテック株式会社
東京都文京区千石2丁目23番3号

(71) 出願人 597147599

トキワサイエンス有限会社
福岡県筑紫野市筑紫駅前通1-130-1

(72) 発明者 松尾 友明

鹿児島県日置郡伊集院町妙円寺2-11-7

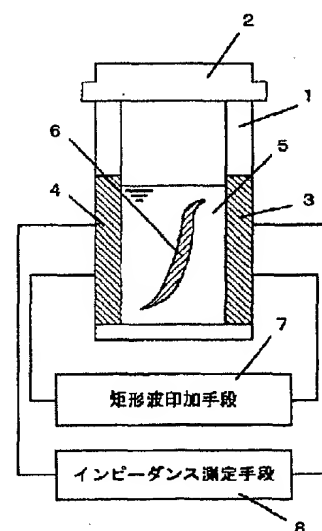
(74) 代理人 弁理士 平野 一幸

(54) 【発明の名称】 エレクトロポレーションによるDNA導入方法

(57) 【要約】

【課題】 プロトプラスト化せずに、植物細胞にDNAを導入できるエレクトロポレーションによるDNA導入方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 細胞壁を残したままの植物組織6、器官又は植物体を、DNA又はDNAのベクターを含ませた緩衝液5に浸漬し、緩衝液にDCパルスを加しDNA又はDNAのベクターを植物組織、器官又は植物体を構成する植物細胞内に導入する。



- 1 キュベット
- 2 ふた
- 3、4 電極
- 5 緩衝液
- 6 植物組織

【特許請求の範囲】

【請求項1】細胞壁を残したままの植物組織、器官又は植物体を、DNA又はDNAのベクターを含ませた緩衝液に浸漬し、前記緩衝液にDCパルスを加し前記DNA又はDNAのベクターを前記植物組織、器官又は植物体を構成する植物細胞内に導入することを特徴とするエレクトロポレーションによるDNA導入方法。

【請求項2】前記DCパルスは、パルス幅と電圧が設定された矩形波であることを特徴とする請求項1記載のエレクトロポレーションによるDNA導入方法。

【請求項3】前記DCパルスを印加する前後において、前記緩衝液のインピーダンスを計測することを特徴とする請求項1記載のエレクトロポレーションによるDNA導入方法。

【請求項4】前記植物組織は、ニンジン塊根切片、キャベツ葉切片、ジャガイモ塊根切片又はベチュニア茎切片のいずれかであることを特徴とする請求項1記載のエレクトロポレーションによるDNA導入方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エレクトロポレーションによる植物組織へのDNA導入方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】植物細胞に、DNAを導入する方法には、間接法と直接法とがあり、さらに、この直接法のうち、電気パルスを利用するものとして、エレクトロポレーション法が知られている。

【0003】さて、植物細胞は、動物細胞と異なり、細胞膜の外側にセルロースからなる細胞壁を有する。したがって、細胞壁に包まれた植物細胞内に、DNAを導入しようとするなら、DNAを、細胞膜だけでなく、細胞壁をも通過させなければならない。そして、従来、電気パルスのみによって、DNAを、細胞膜と細胞壁とを一度に通過させることはできないものと信じられていた。

【0004】このため、従来のエレクトロポレーション法では、まず、DNAを導入したい植物細胞をプロトプラストにした上で、電気パルスを印加していた。即ち、従来のエレクトロポレーション法では、プロトプラスト再分化系が必須のものとなっていた。これにより、形質転換を植物で作製することが可能になる。

【0005】ここで、プロトプラストとは、細胞をばらばらにし、植物細胞から細胞壁を取り除き（ペクチナーゼ、セルラーゼを用いる）、外部に細胞膜を露呈させたものである。そして、このプロトプラストは、植物細胞が生命活動を維持できる最小の単位である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、このような技術では、プロトプラストにするための装置や手間がかかるだけでなく、植物生体の本来の姿から、遠くか

け離れた形態（プロトプラスト）でないと、DNAを導入できないことになる。

【0007】そこで本発明者は、植物生体の本来の姿に近い状態で、DNA導入を行うことができないものかと、鋭意研究の結果、本発明を完成するに至ったものである。即ち、本発明は、プロトプラスト化せずに、植物細胞にDNAを導入できるエレクトロポレーションによるDNA導入方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明のエレクトロポレーションによるDNA導入方法では、細胞壁を残したままの植物組織、器官又は植物体を、DNA又はDNAのベクターを含ませた緩衝液に浸漬し、緩衝液にDCパルスを印加しDNA又はDNAのベクターを植物組織、器官又は植物体を構成する植物細胞内に導入する。この構成により、プロトプラスト化せずに、植物細胞にDNAを導入できる。

【0009】

【発明の実施の形態】請求項1記載のエレクトロポレーションによるDNA導入方法では、細胞壁を残したままの植物組織、器官又は植物体を、DNA又はDNAのベクターを含ませた緩衝液に浸漬し、緩衝液にDCパルスを印加しDNA又はDNAのベクターを植物組織、器官又は植物体を構成する植物細胞内に導入する。この構成により、細胞壁を残し、より植物生体に近い状態で、植物細胞にDNAを導入できる。

【0010】請求項2記載のエレクトロポレーションによるDNA導入方法では、DCパルスは、パルス幅と電圧が設定された矩形波である。この構成により、DCパルスのパルス幅と電圧を調整することにより、緩衝液の成分や植物組織の性質に合わせたパルスを印加できる。

【0011】請求項3記載のエレクトロポレーションによるDNA導入方法では、DCパルスを印加する前後において、緩衝液のインピーダンスを計測する。この構成により、インピーダンスの変化を調べて、DCパルスの最適化を図ることができる。

【0012】次に図面を参照しながら、本発明の実施の形態について説明する。図1は、本発明の一実施の形態におけるDNA導入装置の概念図である。図1において、1は、透明プラスチックからなるキューベットであり、角柱状をなす。2は、キューベット1の上端開口部を封鎖するふたであり、キューベット1の対向面には、一対の電極3、4（本形態では、アルミニウム板）が設けられている。5は、キューベット1に入れられる緩衝液であり、通常、20～800 μ l程度の体積で、例えば、マニトールやNaCl液を主材とする。そして、この緩衝液5には、DNA又はDNAのベクターが所定量浸漬される。ここで、本形態では、pBI221を添加している。

【0013】6は、細胞壁を残したままの（プロトプラ

ストではない)植物組織である。本形態では、後述するように、植物体の器官の切片を用いている。植物組織6は、少なくともDCパルス印加する前に、キュベット1の緩衝液5に浸漬される。なお、同様に、植物組織、器官又は植物体について、本発明を適用できる。7は、矩形波印加手段である。矩形波印加手段7は、電極3、4に接続され、緩衝液5にDCパルスを印加するものであって、 $100\mu\text{s}$ ~ 1000msec のパルス幅、1~ 500V の電圧、パルス回数を設定可能なものが望ましい。8は、インピーダンス測定手段であり、DCパルス印加前後において、電極3、4間(緩衝液5)のインピーダンスを測るものである。

【0014】さて、後述するように、本発明者の実験により明らかになった点であるが、細胞壁を残したままの状態でも、緩衝液5にDCパルスを印加すると、少なくとも植物細胞の細胞膜に、微細な小孔があき、この小孔を介して、細胞外から細胞内へ分子量の大きな物質(例えば、DNAやDNAのベクター)の導入が可能になる。

【0015】ここで、この小孔があくということは、細胞に損傷が起こることに他ならないが、細胞の損傷が過大でなければ、DCパルスの印加後、細胞の自己修復機能によって小孔が塞がれて、細胞は生存し続ける。しかし、DCパルスを強くしてゆくと、ある条件以上では、細胞の損傷が無視できない程度となり、DCパルスの印加後に小孔が残ったままの状態となる。その結果、細胞内の物質が緩衝液5に滲出し、滲出量次第では、細胞が死に至ることになる。ここで、細胞内の物質が緩衝液5に滲出すると、緩衝液5の電気化学的特性が変化し、インピーダンスにも変化があらわれる。

【0016】さて、細胞内にDNAなどを導入しやすくするには、DCパルスを強くする方が良いが、せっかく細胞にDNAを導入しても、過大なDCパルスによって細胞が死滅してしまうのでは、本末転倒になってしまう。そこで、本形態では、DCパルスの印加前後において、インピーダンス測定手段8を用いて、インピーダンスの変化を繰り返し計測することにより、細胞が死なない範囲において、できるだけ大きなDCパルスを印加できる最適な条件を探している。

【0017】以上の前提をふまえた上で、本発明者は、以下の実験を行った。因みに、DNA自体が細胞に導入されたかどうかを直接測ることは困難であるので、導入したDNAから細胞内で合成される酵素の活性、GUS酵素活性を示す蛍光強度(3試料の平均値)を計測した。また、この蛍光強度は、DNAが全く導入できていなければゼロとなり、導入されたDNAの量が増える、より大きな値となる。

【0018】(実験1)植物組織6として、ニンジン塊根切片を用いた。また、導入するDNAは、pBI221であり、 $300\mu\text{l}$ のHCKMの緩衝液5に $40\mu\text{g}$

浸漬した。また、パルス回数を5とした。そして、導入を試みた後、3日間培養し蛍光強度を測定した。なお、電極3、4には、極性を入れ替えた電圧を2回かけた。ここで、HCKMとは、 10mM HEPES + 5mM CaCl_2 + 80mM KCl + 0.425mM Mannitol (pH7.2)である。

【0019】パルス幅(msec)と電圧(V)をパラメータとした結果は、以下の通りである。

パルス幅	80	電圧	50	蛍光強度	11
パルス幅	80	電圧	70	蛍光強度	95
パルス幅	80	電圧	110	蛍光強度	148
パルス幅	80	電圧	150	蛍光強度	37
パルス幅	40	電圧	50	蛍光強度	7
パルス幅	40	電圧	70	蛍光強度	52
パルス幅	40	電圧	110	蛍光強度	85
パルス幅	40	電圧	150	蛍光強度	81

【0020】(実験2)植物組織6として、キャベツ葉切片を用いた。また、導入するDNAは、pBI221であり、 $300\mu\text{l}$ のHCKMの緩衝液5に $40\mu\text{g}$ 浸漬した。また、パルス回数を5とした。そして、導入を試みた後、3日間培養し蛍光強度を測定した。なお、電極3、4には、極性を入れ替えた電圧を2回かけた。

【0021】パルス幅(msec)と電圧(V)をパラメータとした結果は、以下の通りである。

パルス幅	80	電圧	50	蛍光強度	9
パルス幅	80	電圧	70	蛍光強度	29
パルス幅	80	電圧	110	蛍光強度	53
パルス幅	80	電圧	150	蛍光強度	46
パルス幅	40	電圧	50	蛍光強度	7
パルス幅	40	電圧	70	蛍光強度	12
パルス幅	40	電圧	110	蛍光強度	16
パルス幅	40	電圧	150	蛍光強度	21

【0022】(実験3)植物組織6として、ニンジン塊根切片を用いた。また、導入するDNAは、pBI221であり、緩衝液5に $40\mu\text{g}$ 浸漬した。また、パルス回数を5とした。そして、導入を試みた後、3日間培養し蛍光強度を測定した。なお、電極3、4には、極性を入れ替えた電圧110(V)をパルス幅80(msec)で、2回かけ、日数毎の経時変化を調べた。

【0023】結果は、以下の通りである。

日数	0	蛍光強度	2.5
日数	1	蛍光強度	7
日数	2	蛍光強度	37
日数	3	蛍光強度	84
日数	4	蛍光強度	92
日数	5	蛍光強度	61

【0024】(実験4)植物組織6として、ジャガイモ塊根切片を用いた。また、導入するDNAは、pBI221である。また、パルス回数を5とした。そして、導入を試みた後、3日間培養し蛍光強度を測定した。な